

- (13) PAU, C.: *Sobre la flora matritense. El Monitor de la Farmacia*, 40: 3-5 (1934), Madrid.
- (14) SENNEN: *Plantes d'Espagne. «Bull. Geogr. Bot.»*, 21 (259): 101-140 (1911), Le Mans.
- (15) SENNEN: *Quelques formes nouvelles ou peu connues de la Flore de Catalogne, Aragón, Valence. «Bol. Soc. Arag. Cien. Nat.»*, 11: 177-215, 229-251 (1912), Zaragoza.
- (16) SENNEN: *Campagnes botaniques du Maroc oriental de 1930 à 1935 des frères Sennen et Mauricio, EE. CC.* (1936), Madrid.
- (17) TUTIN, T. G. et col.: *Flora Europaea*. 1 (1964); 2 (1968): 3 (1972), Cambridge.
- (18) VICIOSO, C.: *Notas sobre la Flora española. «Anal. J. Bot. Madrid»*, 6 (2): 5-92 (1946), Madrid.
- (19) VICIOSO, C.: *Salicáceas de España*. I, F. I. E., núm. 57 (1951), Madrid.

Influencia de la estratificación en frío y la germinación sobre los constituyentes saponínicos en semillas de *Pinus pinea*

por

M.^a TERESA ALSASUA DEL VALLE y MANUEL SANZ MUÑOZ

Premio «Abelló»

SUMMARY

Various sapogenins in *Pinus pinea* seeds have been detected. Three of six sapogenins designated A, B and C run through a column of Al_2O_3 , other two D and E are adsorbed and the sixth F run to non-absorbed filtrate.

Sapogenin E, has been identified by its chromatographic characteristics, as tigogenin.

The quantitative variations of sapogenins A, B and C are similar to one another, during stratification and germination.

Sapogenin D was not found in non-stratified seeds, but it was found in stratified ones and germination produced a significant increase.

Sapogenin E, increased during stratification; at the beginning of germination the highest level was significantly produced but it finally disappeared.

Sapogenin F was not found until the germination of seeds, reaching later its highest level at 180 mm of radicle.

The quantitative variations of sapogenins during cold stratification and germination have shown therefore, that it had certain metabolic activity and for this reason cannot be considered as a ballast material since that both of them exert influence on such sapogenins.

As monosaccharides constituents of saponins in *Pinus pinea* seeds, glucose, fructose and galactose have been identified.

RESUMEN

Se detectaron varias sapogeninas en semillas de *Pinus pinea*. De seis sapogeninas detectadas, cuatro designadas, como A, B, C y F, pasan a través de una columna de Al_2O_3 ; otras dos, D y E, son adsorbidas por ella. Del análisis cromatográfico se deduce que la denominada sapogenina E corresponde a tigogenina.

Las variaciones cuantitativas de las sapogeninas A, B y C, durante la estrati-

ficación en frío y la germinación de las semillas, son similares entre ellas, aunque con ligeras diferencias.

La sapogenina D no se encontró en semillas sin estratificar, pero se halló en estratificadas y sus niveles más altos coinciden con los de las sapogeninas A, B y C; sin embargo, la germinación se comporta de manera diferentes, ya que al principio bajan sus valores para luego subir significativamente.

La sapogenina E tiene muchas variaciones a lo largo de la estratificación, con valores bastante altos; al comienzo de la germinación presentó su máximo contenido, pero en estadios más avanzados desapareció.

La sapogenina F no se encontró a niveles detectables, hasta la germinación de las semillas, alcanzando su máximo nivel en semillas de 180 mm de radícula.

Las variaciones cuantitativas de las sapogeninas durante la estratificación en frío y la germinación de las semillas demuestran que poseen cierta actividad metabólica y por esta razón no pueden considerarse como material de lastre, ya que ambos procesos ejercen influencia sobre ellas.

Se identificaron glucosa, fructosa y galactosa como monosacáridos constituyentes de las saponinas de semillas de *Pinus pinea*.

Desde hace tiempo se había sugerido que las saponinas podían influir o controlar la germinación (Sigmund, 1914; Miller, 1919; Balansard y Pellesier, 1943-1946). Otros autores han probado recientemente (Marchaim Dvrat y Berman, 1970, y Hardman y Dood, 1972) la influencia de las saponinas sobre la germinación, dependiendo de su concentración el que la inhiban o la estimulen. En investigaciones anteriores llevadas a cabo en semillas de *Pinus pinea* sin estratificar, estratificadas y germinadas, encontramos que se producía una abundante espuma al agitar extractos acuosos de semillas. Esto nos hizo sospechar la presencia de saponinas, que fue demostrada más tarde por el procedimiento de Schuman (1941).

En este trabajo se pretende demostrar la presencia de sapogeninas en las semillas de *Pinus pinea* y la influencia que los procesos de estratificación en frío y germinación pueden ejercer en su contenido.

También se realizó la identificación de los glúcidos componentes de las saponinas.

PARTE EXPERIMENTAL

1. MATERIAL Y MÉTODOS

Como material de partida se usaron semillas de *Pinus pinea* procedentes de Coca (Segovia), de una capacidad germinativa del 95 por 100.

La estratificación se efectuó colocando las semillas en capas alternantes sobre vermiculita humedecida a 4° C. Las determinaciones en semillas estratificadas se efectuaron en semillas sometidas a este

proceso durante cuatro días, una, dos y tres semanas, uno, uno y medio, dos y medio y tres meses.

Para la germinación se utilizaron semillas con cubierta, colocadas en una cámara de Jacobsen, a 28-29° C. Las determinaciones se efectuaron en semillas recientemente germinadas y en aquellas en que la radícula de la plántula era de 5-15 mm, 20-50 mm, 100-130 mm y 180 mm.

En todos los experimentos y determinaciones analíticas se operó con semillas privadas de la cubierta.

1.1. Separación y detección de sapogeninas

Cincuenta gramos de semillas privadas de la cubierta se desengrasaron con éter etílico. El residuo se extrajo exhaustivamente con etanol del 80 por 100. El extracto etanólico se hidrolizó durante ocho horas, previa adición de ClH, hasta una máxima concentración de 3N/1. El hidrolizado a su vez se extrajo con éter y los extractos etéreos lavados, desecados, filtrados y evaporados al vacío, dieron un residuo pardo negruzco, que constituyó el extracto bruto de sapogeninas. Este extracto disuelto en metanol caliente fue pasado a través de una columna de Kieselgur (Stahl) de diámetro de 2 cm y 25 gr de adsorbente, y eluido después con cloroformo-metanol (19:1). El filtrado no adsorbido por la columna se evaporó a sequedad, se disolvió en cloroformo, se filtró y se eluyó a través de una columna de óxido de alúmina Merck de 2 cm de diámetro preparada con 30 g de adsorbente; la elución se desarrolló con cloroformo obteniéndose una mancha pardo negruzca en la cima de la columna. El filtrado no adsorbido se concentró al vacío hasta un volumen determinado y se realizó una cromatografía sobre capa delgada.

La banda pardo negruzca que permanece en lo alto de la columna se eluyó con butanol saturado de agua y se separó perfectamente en tres bandas: una banda parda en lo alto de la columna, otra pardo amarillenta en la zona media y otra tercera en la base, de color amarillo. Se recogieron diez fracciones distintas de la columna, que se evaporaron a sequedad, para posteriormente realizar los cromatogramas en capa delgada, previa disolución en cloroformo.

1.1.1. Cromatografía en capa delgada

Material y métodos (según Tschsche, Wulff, 1961, y Bennet Heftman, 1963):

Área de la capa: 20 × 20 cm.

Espesor de la capa: 0,25 mm.

Activación de las placas: 110° C durante una hora.

Equipo de preparación Quickfit.

Para el goteo de las muestras y patrones se usó una microjeringa Hamilton, para diferentes cantidades, desde 5 a 60 μ l.

Como líquido de desarrollo se utilizó una mezcla de disolventes benceno-metanol (92:8).

Revelado: una vez secas las placas a temperatura ambiente se pulverizaron con una mezcla de ácido acético glacial-anisaldehído-ácido sulfúrico concentrado (50:0,5:1). Para la visualización de las manchas es necesario efectuar un calentamiento a 120° C durante quince minutos.

1,1,2. Determinación cuantitativa

Después de preparar las muestras problemas según la técnica anteriormente descrita se cromatografiaron simultáneamente con un patrón de tigogenina de concentración conocida. Se rascaron de las placas las manchas junto con el adsorbente que las contenían, y realizó su elución con cuatro ml de butanol especial para cromatografía. Se centrifugaron a tres mil revoluciones por minuto durante diez minutos, y por último se midieron a 240 nm, las densidades ópticas de los sobrenadantes. Como blancos se utilizaron partes alicótas del fondo rosa de las placas de un área semejante a la de las manchas detectadas.

1,2. Extracción y detección de los glúcidos saponínicos

Trescientos gramos de semillas sin cubierta, se desengrasaron con éter etílico. El residuo se extrajo exhaustivamente con etanol de 95 por 100. Al extracto etanólico concentrado al vacío, se le agregó igual volumen de una solución saturada de colesteroína en etanol, calentándose durante diez minutos y dejando el conjunto veinticuatro horas a la temperatura de la habitación. El precipitado obtenido se disolvió en piridina, y se calentó a reflujo, agregando éter etílico una vez frío. El precipitado de saponinas brutas se disolvió en metanol, se evaporó a sequedad y se hidrolizó durante una hora, previa adición de 2 ml de ácido sulfúrico 2N/1. El hidrolizado se neutralizó con carbonato bórico, se mezcló con tierras de diatomeas lavadas al ácido, se lavó y filtró. El filtrado se pasó por una columna preparada con 1 g de Amberlita IR-120 (H) y 1,2 g de Dualita A-H (OH). Finalmente la solución desionizada se liofilizó.

La identificación de los azúcares se realizó por medio de cromatografía en capa delgada utilizándose como adsorbente sílica gel G suspendido en acetato sódico 0,02 M.

Los azúcares problema liofilizados y los patrones, se disolvieron

en agua tridestilada. El espesor de capa fue de 0,75 mm. Los cromatogramas se desarrollaron con una mezcla de acetato de etilo-isopropanol al 65 por 100 (65:35) durante dos horas; repitiendo la operación tres veces con un recorrido de 15 cm. El revelado se practicó con el reactivo anisaldehído-ácido sulfúrico calentando a 100° C después de la pulverización, hasta neta visualización de los colores de las manchas.

La identificación de los problemas se realizó por comparación de los Rf y tonalidad de color de las manchas con los de patrones muy puros.

2. RESULTADOS

2,1. Cualitativos

Realizando una extracción a partir de dos y medio kilos de semillas privadas de la cubierta, se pudo observar que el residuo bruto obtenido de sapogeninas llevaba una gran cantidad de impurezas y una muy pequeña de sapogeninas. Con el fin de separar éstas por cristalización se hicieron una serie de ensayos con los siguientes disolventes: éter, acetona, cloroformo, etanol, éter-cloroformo, benceno-éter de petróleo, benceno-cloro-benceno y mezclas diversas de dioxano-agua, no obteniéndose resultados satisfactorios.

2,1,1. Sapogeninas

Como control para la determinación de la presencia de sapogeninas se usaron las reacciones siguientes: a) Con ácido sulfúrico concentrado, después de unos minutos aparece un color rojo fuerte que cambia a violáceo más tarde. b) Con unas gotas de una mezcla de ácido sulfúrico concentrado—ácido acético glacial— anisaldehído (1:50:0,5), calentando a 110-105° C se desarrolla un color verde intenso mientras el blanco lo da rosado. c) Con unas gotas de sulfato cérico al 65 por 100 en ácido sulfúrico, calentando durante quince minutos a 120° C, se desarrolla un color negro, mientras que el blanco da color amarillo. Estos controles se efectuaron, en los residuos, en los eluatos de kieselgur y de óxido de alúmina y en pequeñas porciones del adsorbente sacado de la columna de óxido de alúmina, de todos los problemas de las semillas.

Las cromatografías en capa delgada de los eluatos clorofórmicos de las columnas de óxido de alúmina dieron los siguientes resultados:

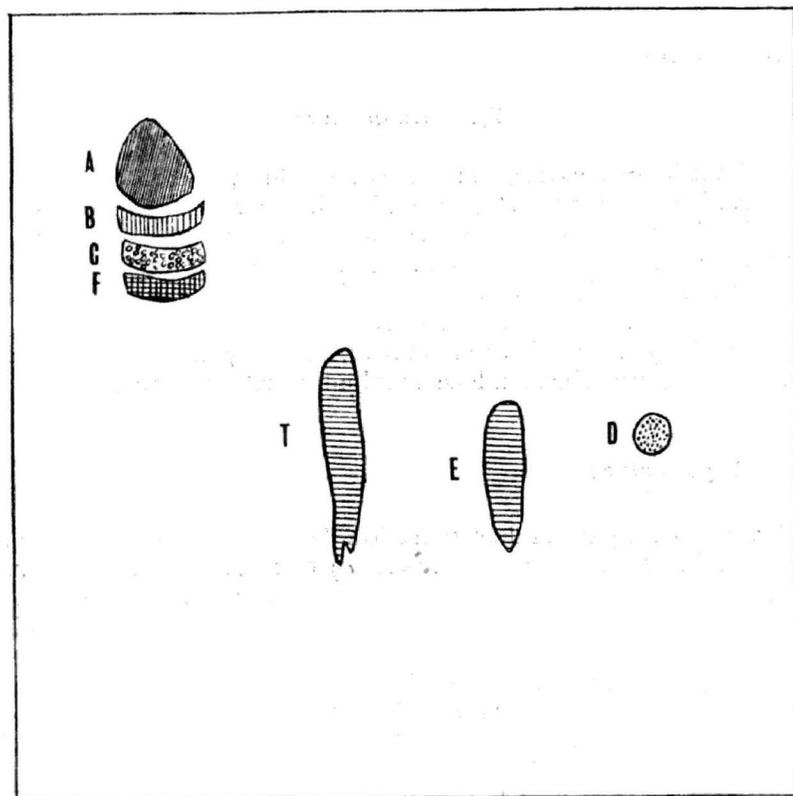
1) Tres manchas claramente visibles que se denominaron A, B y C, con las siguientes características:

A. $R_f = 0,96$, fluorescencia azulada a la luz ultravioleta y color verde intenso al revelado, con reactivo anisaldehído sulfúrico.

B. $R_f = 0,83$, fluorescencia amarilla a la luz U. V., y de color verde claro al revelado.

C. $R_f = 0,83$, sin fluorescencia a la luz U. V., y color rosa al revelado.

Estas tres sapogeninas fueron detectadas tanto en semillas sin estratificar como en estratificadas y en germinadas, con un aumento de color en las manchas después de cuatro días de estratificación.



Cromatograma 1.—Separación de las manchas correspondientes a las sapogeninas en comparación con tigogenina.

Sapogeninas: A, verde muy intenso; B, verde pálido; C, rosa; F, rojo. Proceden de la elución con cloroformo de la columna de óxido de alúmina. D, violeta y E, verde intenso, proceden respectivamente de las fracciones II y III, obtenidas por elución con butanol saturado de agua de la columna de óxido de alúmina. T, verde prado, tigogenina patrón.

2) Una cuarta sapogenina F se encontró solamente en semillas germinadas con un significativo color rojo y un R_f menor.

Las cromatografías en capa delgada de los eluatos con butanol saturado de agua de las columnas de óxido de alúmina dieron los siguientes resultados:

De las diez fracciones recogidas, solamente dieron resultado positivo las fracciones II y III. La fracción II dio una mancha violeta con R_f bajo, designada como sapogenina D. La fracción III dio una mancha mayor de color verde manzana con R_f más alto, designada como sapogenina E.

La sapogenina D no se encontró en semillas sin estratificar, apareciendo a los cuatro días de estratificación para permanecer durante todo el proceso y también durante la germinación.

La sapogenina E, sin embargo, se encuentra en semillas sin estratificar y estratificadas, pero desaparece al tercer estadio de la germinación.

Para la identificación de los problemas se utilizaron las siguientes sapogeninas standard: 1) Hecogenina. 2) Acetato de hecogenina. 3) Diosgenina. 4) Tigogenina. 5) Kriptogenina. 6) Sarsapogenina. 8) Rockogenina. 9) Metilhidroxitigogenina. 10) Metildiosgenina. 11) Cetotigogenina. 12) Digitogenina. Las cinco primeras fueron suministradas por la firma Sigma. Los patrones 8, 9, 10 y 11 por la americana Steraloids. Se comprobaron los puntos de fusión de todas ellas, siendo correctos. La sarsapogenina se purificó por acetilación (Well y col., 1952). La digitogenina se preparó a partir de digitonina y dio un punto de fusión de 280°C .

La comparación cromatográfica de los problemas con los patrones dio un resultado negativo en todos los casos, con excepción de la llamada sapogenina E, cuya mancha presenta el mismo R_f , tonalidad de color y forma que por la presentada por la mancha correspondiente a tigogenina patrón.

2,1,2. Valores máximos de absorción de las reacciones ácido sulfúrico-anisaldehído-sapogeninas.

Para la realización de las determinaciones cuantitativas se estudiaron primeramente los valores de máxima absorción, de los productos de las reacciones ácido sulfúrico-anisaldehído-sapogeninas problema; de ácido sulfúrico-anisaldehído—tigogenina patrón y ácido sulfúrico-anisaldehído-digitogenina patrón, que se verifican al efectuar los cromatogramas. Una vez revelados los cromatogramas y eluidas las manchas con butanol especial para cromatografía se determinaron los espectros de absorción de los problemas y de los patrones mediante un espectrofotómetro Unicam SP 1800 2N con un controlador de programas SP 1805.

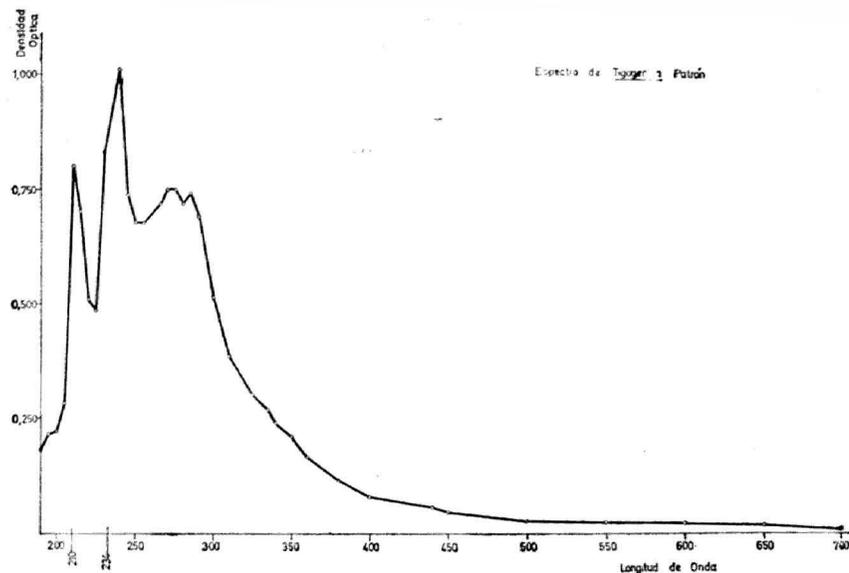


Fig. 1.—Curva de absorción del producto de reacción tigogenina patrón-anisaldehído-ácido sulfúrico. Eje de ordenadas: Densidades ópticas. Eje de abscisas: longitudes de onda en nm. El pico en 240 nm, corresponde a la reacción. Los otros dos picos al anisaldehído sulfúrico.

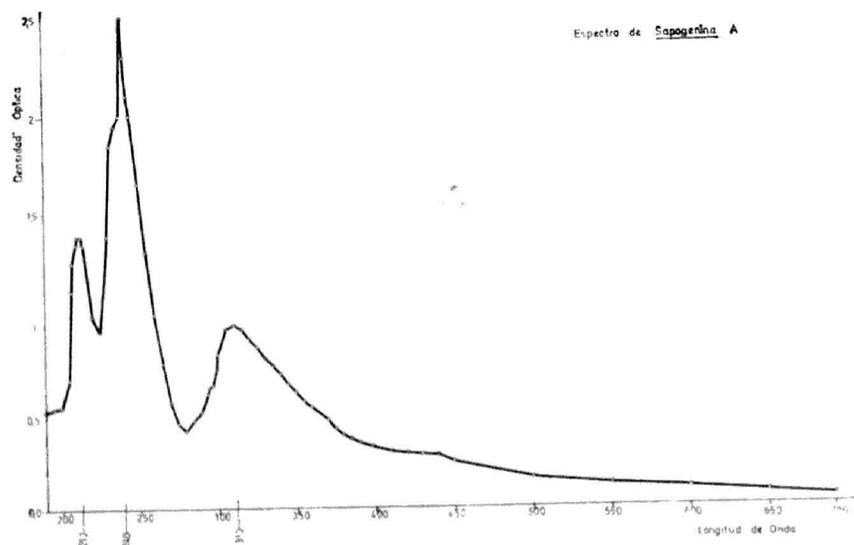


Fig. 2.—Curva de absorción del producto de la reacción sapogenina A-anisaldehído-ácido sulfúrico. Eje de ordenadas: Densidades ópticas. Eje de abscisas: Longitudes de onda en nm. El pico en 240 nm corresponde a la reacción. Los otros dos picos al reactivo anisaldehído-ácido sulfúrico.

En todos los casos se obtuvieron tres máximos de absorción comunes. Tan sólo se representan gráficamente (véase figuras 1, 2 y 3) los espectros de absorción correspondientes a los productos de las reacciones, ácido sulfúrico-anisaldehído-sapogenina A, ácido sulfúrico-anisaldehído-sapogenina E y ácido sulfúrico-anisaldehído-tigogenina. En ellos se puede ver la existencia de tres picos; el pico en 240 nm corresponde a la reacción, y los otros dos picos al reactivo ácido sulfúrico-anisaldehído. Esto último se demuestra al determinar los espectros de absorción de los blancos frente a butanol-agua destilada.

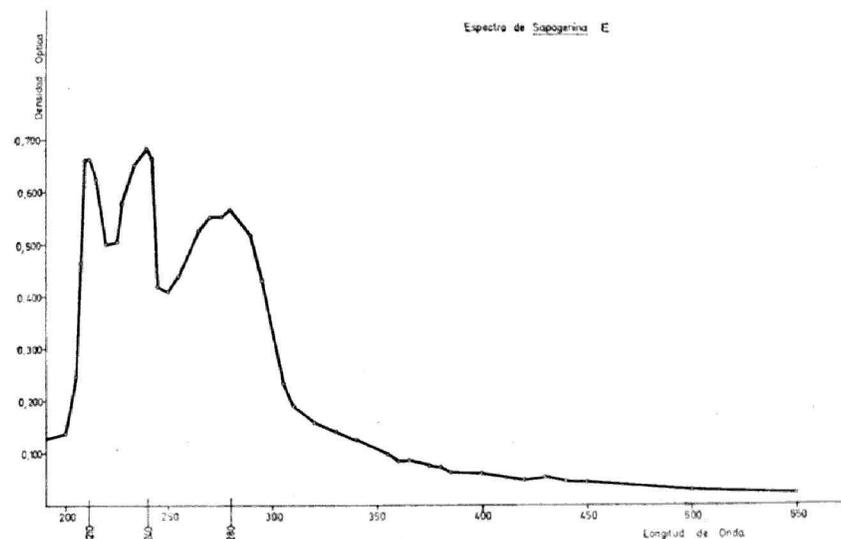


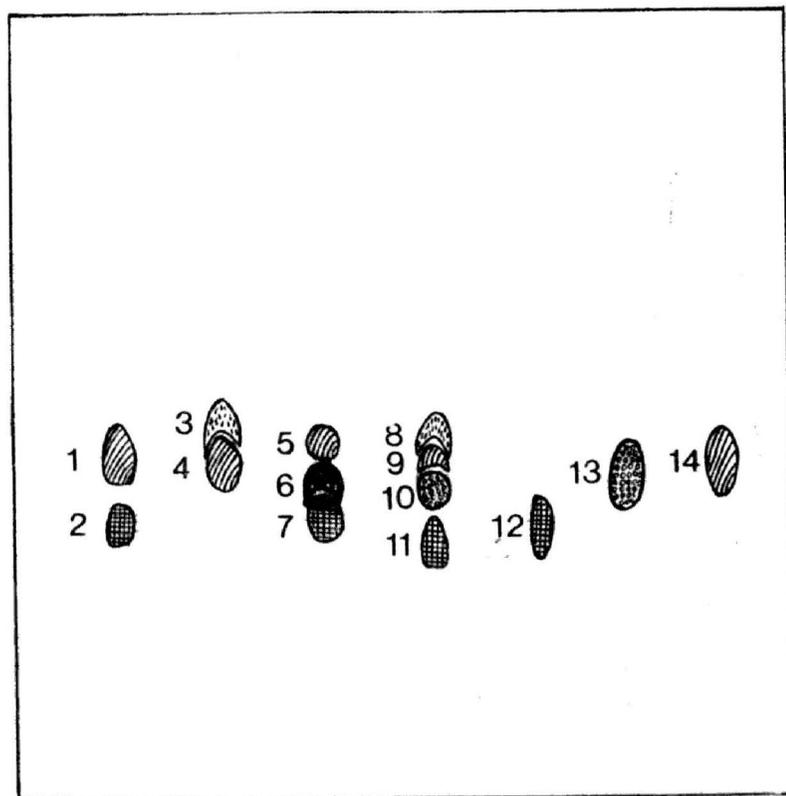
Fig. 3.—Curva de absorción del producto de la reacción sapogenina E-anisaldehído-ácido sulfúrico. Eje de ordenadas: Densidades ópticas. Eje de abscisas: Longitudes de onda en nm. El pico en 240 nm corresponde a la reacción. Los otros dos picos al reactivo anisaldehído-ácido sulfúrico

Con el fin de verificar si las reacciones de ácido sulfúrico-anisaldehído-tigogenina y ácido sulfúrico-anisaldehído-digitogenina utilizadas como patrones seguían la ley de Beer y poder después efectuar las determinaciones cuantitativas, se realizaron varios cromatogramas con diferentes concentraciones de cada una de ellas y determinaron los espectros de absorción en 240 nm, como se refirió anteriormente.

Se comprobó que siguen dicha ley a concentraciones de 10-50 μg . Entre estos valores se verificaron siempre las determinaciones.

2,1,3. *Glúcidos saponínicos*

Se realizaron más de 30 cromatogramas con las muestras problema y los patrones por separado y con mezclas de 2, 3, 4 o más tipos de azúcares usando la técnica descrita anteriormente. Se efectuaron ensayos con sílica gel G y con kieselgur G, obteniéndose una mejor separación y resolución de las manchas con el primero. Se detectaron glucosa, fructosa y galactosa, pero no pentosas ni diholósidos. El Rf más alto fue el de glucosa y el más bajo el de galactosa. Sobre placas



Cromatograma 2.—Osas patrón y problemas empleados: 1, glucosa, verde intenso; 2, galactosa, verde claro; 1 + 2, mezcla de patrones; 3, arabinosa, amarillo verdoso; 4 glucosa, verde intenso; 3 + 4, mezcla de patrones; 5, glucosa, verde intenso; 6, fructosa, azul; 7, galactosa, verde claro; 5 + 6 + 7, saponinas problema; 8, arabinosa, amarillo verdosa; 9, glucosa, verde intenso; 10, fructosa, azul intenso; 11, galactosa, verde claro; 8 + 9 + 10 + 11, mezcla de patrones; 12, galactosa, verde claro; 13, fructosa, azul intenso; 14, glucosa, verde intenso;

de sílica gel G y una vez revelados las osas dieron los siguientes colores: verde amarillento para la glucosa, azul para la fructosa y verde claro para la galactosa. Véase cromatograma 2.

2,2. *Cuantitativos*

Los resultados se incluyen en las tablas 1 y 2 y figuras 4 y 5. Para los cálculos se tomó tigenina como patrón y se refirieron a 100 g de peso seco.

TABLA 1

Mg de saponinas en 100 g de peso seco de piñón total
Referido a tigenina patrón

	Sin estratificar	Estratificadas							
		4 d	1 s	2 s	3 s	1 m	1,5 m	2,5 m	3 m
Sapogenina A...	3,09	104,57	44,24	60,82	52,99	36,85	6,28	34,61	21,60
Sapogenina B...	1,19	45,70	8,77	36,94	13,44	1,69	4,09	22,96	2,51
Sapogenina C...	1,21	11,93	2,58	6,03	0,79	2,10	5,73	5,33	2,45
Sapogenina D...	0,00	6,47	3,80	2,96	2,20	3,25	4,94	6,13	3,66
Sapogenina E...	3,34	3,14	6,97	5,52	1,54	5,80	1,22	6,78	2,48

TABLA 2

Mg. de saponinas en 100 g de peso seco de piñón total
Referido a tigenina patrón

	Recien germinadas	Germinadas: Longitud de radícula			
		5-15 mm	20-50 mm	100-130 mm	180 mm
Sapogenina A...	33 05	88,81	38,44	35,43	65,40
Sapogenina B...	6,89	17,79	11,84	10,74	30,64
Sapogenina C...	4,90	10,22	3,57	4 19	11,39
Sapogenina D...	3,25	2,20	1,48	6,13	8,36
Sapogenina E...	2,13	8,57	2,50	—	—
Sapogenina F...	3,08	3,25	5,02	4,31	12,67

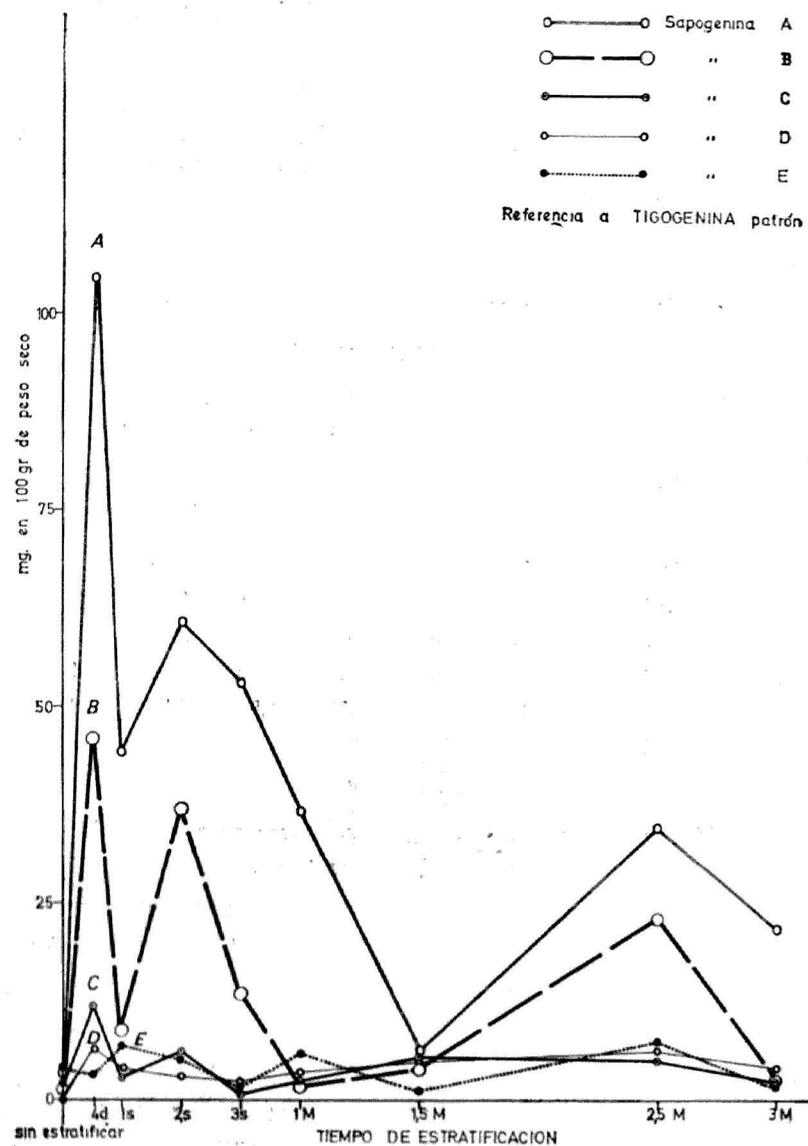


Fig. 4.—Curvas del contenido de sapogeninas A, B, C, D, E y F durante la estratificación en frío. Eje de ordenadas: Mg. de sapogenina por 100 g de peso seco. Eje de abscisas: Tiempo de estratificación expresado en días, semanas y meses. Como patrón de referencia se toma tigenina.

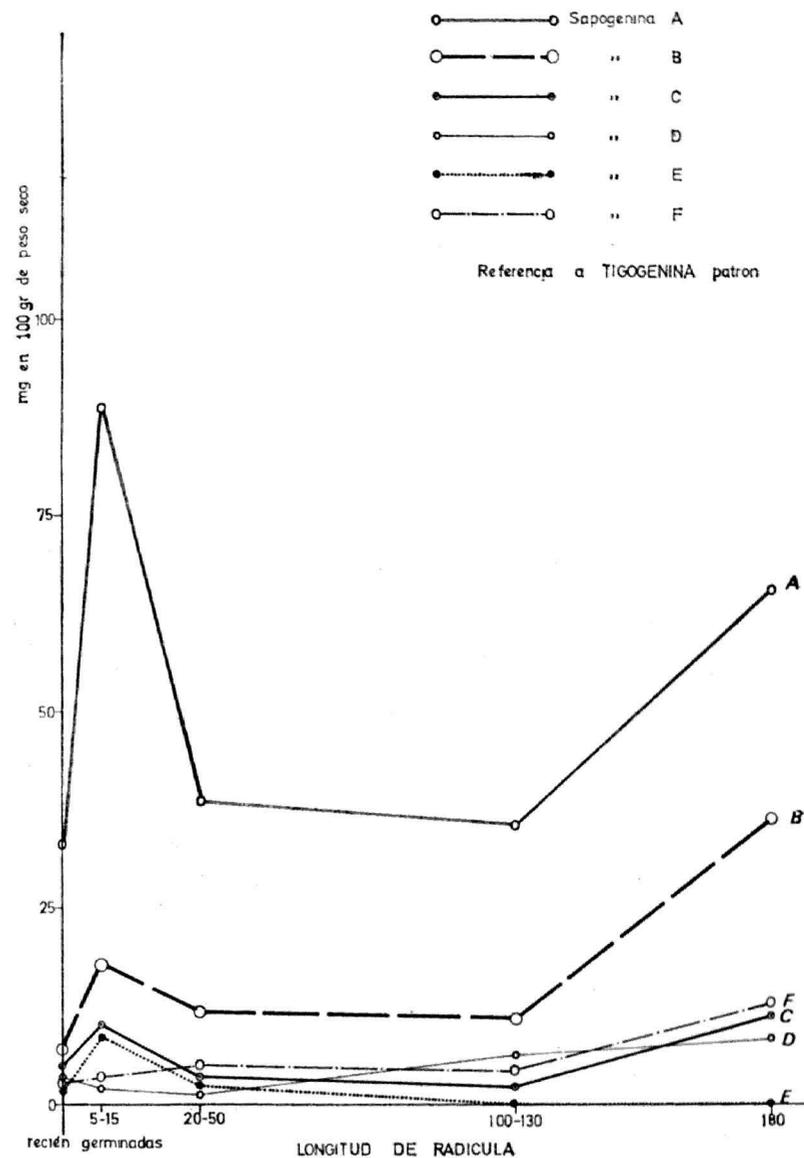


Fig. 5.—Curvas del contenido de sapogeninas A, B, C, D, E y F durante la germinación. Eje de ordenadas: Mg. de sapogeninas por 100 g de peso seco. Eje de abscisas: Las determinaciones referidas a semillas según la longitud de radícula, en mm.

DISCUSIÓN

Todos los ensayos dirigidos al aislamiento y cristalización de las sapogeninas no tuvieron éxito como consecuencia de la enorme cantidad de materias extrañas que poseían los residuos o eluatos a cristalizar, en comparación con la pequeñísima cantidad de sapogeninas.

La identificación de las sapogeninas problema como compuestos conocidos por comparación con patrones muy puros en cromatografía en capa delgada, solamente dio resultado positivo en el caso de sapogenina E, que presenta las mismas características cromatográficas que los patrones de tigogenina.

No obstante, la presencia de las sapogeninas quedó completamente confirmada, por las reacciones positivas acusadas en los extractos brutos obtenidos por el método general para la determinación de sapogeninas; por las reacciones positivas en los eluatos de las columnas de Kieselgur y de óxido de alúmina; por las manchas obtenidas por cromatografía en capa delgada propia de sapogeninas y por los picos en 240 nm de la reacción anisaldehído-ácido sulfúrico-sapogenina problema, similar a los presentados por la reacción anisaldehído-ácido sulfúrico-sapogeninas patrón.

Durante la estratificación en frío la sapogenina A experimenta un significativo aumento después de cuatro días, para disminuir hasta pasados cuatro semanas, donde vuelven a aumentar sus valores; después de dos meses y medio disminuyen otra vez. También experimenta un aumento significativo en los primeros estadios de la plántula en crecimiento (radícula de 5-15 mm), para luego disminuir y permanecer a niveles constantes. Finalmente vuelve a incrementar de nuevo.

El comportamiento de las sapogeninas B y C durante la estratificación en frío y la germinación fue semejante al de la sapogenina A, pero los valores cuantitativos fueron mucho más bajos.

La sapogenina D no se encontró en semillas sin estratificar, pero a los cuatro días de estratificación se inicia su presencia de manera significativa, teniendo sus máximos valores en los últimos estadios de la plántula en crecimiento (longitudes mayores de radícula).

El nivel más alto de la sapogenina E se logra después de una semana de estratificación, a diferencia de las otras sapogeninas que lo alcanzan a los cuatro días, pero luego sigue el mismo curso. En la germinación tiene su máximo nivel a una longitud de radícula entre 5-15 mm, pero en los últimos estadios experimentados desaparece.

Estas dos últimas sapogeninas presentan durante la germinación valores más altos que durante la estratificación, a diferencia de las sapogeninas A, B y C, que los presentan en la estratificación.

En extractos obtenidos a partir de 50 g de semillas sin cubierta, no se encontró sapogenina F, ni en semillas sin estratificar ni estra-

tificadas; solamente se pudo detectar indicios a partir de un extracto de 2,5 kg de semillas sin cubierta. Esto demuestra la cantidad tan sumamente pequeña existente en semillas sin estratificar y estratificadas.

La producción de sapogenina F fue intensamente estimulada por la germinación, manteniendo sus valores constantes hasta que se elevan de manera significativa en el último estadio.

Por otra parte, se puede observar en la figura 1 que las cantidades de sapogeninas (A, B, C, D, E y F) aumentan significativamente durante la estratificación y la germinación, en comparación con las que hay en semillas sin estratificar. Las sapogeninas D y E ofrecen sus máximos niveles en la germinación.

El significativo aumento de las sapogeninas, provocado por la estratificación y la germinación, fue paralelo al incremento de saponinas en condiciones semejantes de estratificación y germinación, hecho ya demostrado por nosotros en otro trabajo.

Debido a estas variaciones cuantitativas puede deducirse que las sapogeninas están involucradas activamente en ambos procesos de estratificación y germinación. Estos resultados coinciden con lo afirmado por otros autores que confirman el hecho de que en ciertas semillas la germinación provoca un incremento en el contenido de saponinas y por ende el de sapogeninas.

BIBLIOGRAFÍA

- BALANSARD, J. y PELLESIER, F. 1943. «Compt. Rend. Soc. Biol.», 137, 461-462, y 137, 523-525 y 137-454.
- BALANSARD, J. y PELLESIER, F. 1945. «Compt. Rend. Soc. Biol.», 139, 1098-1100.
- BALANSARD, J. y PELLESIER, F. 1946. «Compt. Rend. Soc. Biol.», 140, 140-2.
- BENNET, R. D., HEFTMAN, E., PRESTON, V. H. JR. y HAN, J. R. 1963. «Arch. Biochem. Biophys.», 103, 78-83.
- HARDMAN, R. y WOOD, C. N. 1972. «Phytochemistry», 11 (3), 1067-71.
- MARCHAIM, V. B., DVRAT y BERMAN, T. 1970. «Plant Cell. Physiol.», 11 (3), 511-14.
- MILLER, M. R. 1919. «Nevada Agric. Expt. Report Annual Report of the board for fiscal year ending June 30 and Expt. Sta. Rec.», 43: 273, 32-33.
- SCHUMAN, G. 1941. «Arch. Pharm.», 279, 67.
- SIGMUND, W. 1914. «Biochem. Z.», 62: 339-386.
- WALTER, E. D., VAN AATTA, G. R., THOMPSON, C. R. y MACLAY, W. S. 1954. «J. Am. Chem. Soc.», 76, 2271-2273.
- TSCHECHÉ, R. y WULFF, G. 1961. «Chem. Ber.», 94, 2019.